

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 781 231

②① N° d'enregistrement national : **98 09193**

⑤① Int Cl⁷ : C 07 K 14/635, A 61 K 7/00, 7/48, 38/29, A 61 P 17/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 17.07.98.

③③ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : *SEDERMA SA Société anonyme — FR.*

⑦② Inventeur(s) : LINTNER KARL.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.01.00 Bulletin 00/03.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ COMPOSITIONS COSMETIQUES AMINCISSANTES.

⑤⑦ Le brevet décrit les séquences peptidiques possédant
une activité lipolytique qui peut être mise à profit dans des
produits cosmétiques amincissants utilisés par voie topique.
Cette activité est renforcée quand les peptides sont modi-
fiés chimiquement pour augmenter la lipophilie.

Ces peptides peuvent être obtenus par synthèse, par
biotechnologie ou par hydrolyse ménagée de protéines vé-
gétales.

FR 2 781 231 - A1



L'industrie cosmétique est en permanence à la recherche de nouveaux ingrédients actifs possédant des activités lipolytiques, pour les intégrer dans des produits dits amincissants. De nombreuses substances (molécules pures comme les dérivés de xanthines; mélanges complexes comme certains extraits de plantes, ...) sont
5 proposées et utilisées.

Le marché demande néanmoins des nouveautés et des produits encore plus actifs. Les substances adrénérergiques (adrénaline et analogues) sont bien connues pour leur impressionnante capacité à stimuler la lipolyse dans les adipocytes mais, leur emploi est formellement interdit en cosmétique et en dermopharmacie.

10 Récemment, d'autres classes de substances, de nature différente, ont été identifiées comme étant également capables de stimuler, à des degrés divers, la lipolyse des triglycérides dans les adipocytes humains et/ou animaux.

Il s'agit de peptides de courte chaîne à caractère hormonal comme, par exemple, l'hormone para-thyroïdienne (pTH(1-84)) ou son fragment pTH(1-34).

15 Ces peptides sont susceptibles de stimuler la lipolyse, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, par le biais de l'activation de l'adénylate cyclase membranaire (par exemple: Tanigushi A. et al. *J. Lip. Res.* (1987) 28 :490-496).

Malheureusement, le plus petit des deux peptides mentionnés ci-dessus, le pTH (1-34), comporte une séquence de 34 acides aminés (H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-
20 Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH), ce qui rend sa synthèse à l'échelle industrielle très difficile, et par conséquent son utilisation incompatible avec les exigences économiques du marché cosmétique visé.

L'objet du présent brevet est la découverte que des séquences peptidiques plus
25 courtes, et donc plus réalistes quant à la possibilité d'en faire la synthèse industrielle, ainsi que certains analogues chimiquement modifiés sont également actifs dans la stimulation *in vitro* et *in vivo* de la lipolyse. Contrairement à toute attente cette activité se retrouve *in vivo* après application par voie topique, et donc dans une approche relevant de la cosmétique.

Sont donc concernés par ce présent brevet, les divers fragments du peptide pTH-(1-34), caractérisés en ce qu'ils contiennent la séquence de forme générale suivante :



où R^1 = H, ou une chaîne alkyle, linéaire ou branchée, saturée ou insaturée, hydroxylée ou soufrée ou non, contenant 1 à 24 atomes de carbone, préférentiellement 12 à 18 atomes de carbone,

et R^2 = H, ou une chaîne alkyle de C1 à C24, préférentiellement soit C1 à C3, soit C14 à C18 ou $O-R^2=NR^3R^4$ avec R^3 et R^4 étant indépendamment l'un de l'autre =H ou une chaîne alkyle de 1 à 12 atomes de carbone, préférentiellement de 1 à 3 atomes de carbone,

et AA est tout ou partie de la séquence peptidique suivante : Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn (pTH(1-10)), préférentiellement Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln (pTH(1-6)), et n compris entre 3 et 10 inclus, préférentiellement entre 3 et 6.

Les peptides qui répondent aux séquences décrites ci dessus possèdent une réelle et importante activité lipolytique par voie topique qui est utilisable en cosmétique et dermopharmacie.

Enfin, pour rendre tous ces peptides encore plus actif par voie topique, il est avantageux de les rendre lipophiles par un greffage d'un acide gras de plus ou moins longue chaîne (mirystyl, palmityl, stéaryl, lipoyl...) sur l'amine N-terminale et/ou d'estérifier le groupe carboxyle du peptide.

Les peptides, objets du brevet, peuvent être obtenus soit par synthèse chimique classique (en phase solide ou en phase homogène liquide), soit par synthèse enzymatique (Kullman et al., J. Biol. Chem. 1980, 255, 8234) à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs dérivés.

Les peptides peuvent être obtenus également par fermentation d'une souche de bactéries modifiées ou non par génie génétique, pour produire les séquences recherchées ou leurs différents fragments.

Enfin, les peptides peuvent être obtenus par extraction de protéines d'origine animale ou végétale, préférentiellement végétale, suivie d'une hydrolyse contrôlée

qui libère les fragments peptidiques en question, avec la stipulation que les fragments libérés correspondent aux séquences peptidiques pTH(1-n) avec n compris entre 3 et 10 inclus. De nombreuses protéines trouvées dans les plantes sont susceptibles de contenir ces séquences au sein de leur structure. L'hydrolyse ménagée permet de dégager ces fragments peptidiques.

Pour réaliser l'invention, il est possible, mais non nécessaire, d'extraire soit les protéines concernées d'abord et de les hydrolyser ensuite, soit d'effectuer l'hydrolyse d'abord sur un extrait brut et de purifier les fragments peptidiques ensuite. On peut également utiliser l'hydrolysât sans en extraire les fragments peptidiques en question, en s'assurant toutefois d'avoir arrêté la réaction enzymatique d'hydrolyse à temps et de doser la présence des peptides en question par des moyens analytiques appropriés (traçage par radioactivité, immunofluorescence ou immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques, etc.). D'autres procédés plus simples ou plus complexes conduisant à des produits moins chers ou plus purs sont facilement envisageables par l'homme de l'art connaissant le métier d'extraction et de purification des protéines et peptides.

A titre d'exemple illustrant l'invention, on cite quelques formules cosmétiques représentatives mais non limitatives de l'invention:

Exemple n° 1: Gel amincissant

20	Carbopol 1342 ^R	0,3
	Propylène glycol	2,0
	Glycérine	1,0
	Vaseline blanche	1,5
	Cylomethicone	6,0
25	Sipol C16C18S3	0,5
	Lubrajel ^R MS	10
	triéthanolamine	0,3
	N-Acetyl-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-OH	0,001
	N-Palmitoyl-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-OH	0,00005
30	Eau, conservateurs, parfum	qsp 100 g.

Exemple n°2: Crème amincissante

	Brij ^R 721	2.4
	Brij ^R 72	2.6
	Arlamol ^R E	8.0
5	Cire d'abeille	0.5
	Abil ^R ZP 2434	3.0
	Propylène glycol	3.0
	Carbopol ^R 941	0.25
	Triéthanolamine	0.25
10	N-Lipoyl-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-OH	0.00001
	Caféine	1.0
	Eau, conservateurs, parfums qsp	100 g

Exemple n° 3: Lotion alcoolique

	Ethanol	5.0
15	Propylène glycol	2.0
	Abil ^R B8851	0.5
	Eumulgin ^R L	0.6
	H ₂ N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-OMe	0.0002
	eau, conservateurs, parfum qsp	100 g

20 L'activité des peptides sera démontrées par les deux exemples suivants:

Exemple n° 4: Activité lipolytique *in vitro*

25 Des adipocytes humains (obtenus à partir de morceaux de peau prélevés lors de la chirurgie plastique) sont mis en suspension dans un milieu de survie. On ajoute alors différentes concentrations de H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-OH (pTH(1-6)) et, après 2 heures d'incubation à 37°C, on mesure la quantité de glycérol et d'acides gras libérés dans le milieu extérieur.

30 Dans les mêmes conditions, le métabolisme lipolytique de base et une série de contrôles positifs sont réalisés, respectivement en l'absence du peptide testé ou en présence de différentes concentrations de pTH(1-34) qui est alors considéré comme produit de référence.

Dans ces conditions, les libérations de glycérol observées au cours de cinq essais différents sont les suivantes:

Basal	$17,0 \pm 1,1 \text{ nmol}/2,5.10^5 \text{ cellule}/2\text{hr}$
pTH(1-34) à 10^{-7} M/l	$21,8 \pm 0,7 \text{ nmol}/2,5.10^5 \text{ cellule}/2\text{hr},$
pTH(1-6) à 10^{-6} M/l	$19,9 \pm 0,9 \text{ nmol}/2,5.10^5 \text{ cellule}/2\text{hr},$

Ce qui correspond selon le peptide testé, à une augmentation de la libération basale de glycérol de respectivement 28% et 17%.

Dans ce même modèle, nous avons testé un certain nombre de peptides dérivés de la séquence de base. Par exemple:

- pour augmenter la durée de vie du peptide (vis à vis des enzymes protéolytiques) nous avons substitué l'acide glutamique en position 4 par l'acide D-glutamique et/ou la méthionone en position 8 par la norleucine,
- pour augmenter l'affinité du peptide pour la peau, nous avons attaché une chaîne aliphatique (allant de C1 à C24) soit à l'extrémité N-terminale (liaison amide), soit à l'extrémité C-terminale (liaison ester) du peptide.

En présence de $1 \cdot 10^{-6} \text{ M/l}$ de produit, les augmentations de la libération basale de glycérol observées sont les suivantes:

pTH(1-10):	+ 18 %
pTH(1-8):	+ 10 %
D-Glu ⁴ -pTH(1-6):	+ 17 %
Nle ⁸ -pTH(1-10):	+ 11 %
Pal-pTH(1-10):	+ 21 %

On voit donc qu'il est possible de moduler l'activité lipolytique de la séquence principale selon les besoins (solubilité, durée d'action, affinité épidermique).

D'autres variantes peuvent être envisagées par l'homme de l'art tout en restant dans le champ de l'invention.

Dans les mêmes conditions expérimentales, on peut également suivre la variation de la concentration d'AMPC (Adénosine monophosphate cyclique) dans le milieu cellulaire.

En fait, l'activation de la lipolyse dans les adipocytes passe souvent, sinon toujours, par la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase à la suite de laquelle la concentration élevée de l'AMPc conduit à l'activation prolongée des triglycérides lipases. Les peptides étudiés possèdent des activités stimulatrices de l'adénylate cyclase diverses qui ne sont pas linéairement liées à l'activité lipolytique, ce qui indiquerait que différents mécanismes d'activation de la lipolyse interviennent selon le peptide. Certains peptides sont fortement lipolytiques sans pour autant stimuler notablement l'adénylate cyclase, d'autres possèdent les deux activités à un degré élevé.

L'utilisation conjointe de certains peptides objets de la présente demande de brevet peut s'avérer particulièrement avantageuse.

Exemple n° 5: Activité lipolytique *in vivo*

Un test *in vivo*, effectué sur 15 femmes âgées de 35 à 62 ans pendant quatre semaines, a consisté à suivre l'évolution de deux paramètres, le périmètre des cuisses mesuré à l'aide d'un centimètre et l'épaisseur de la couche adipeuse déterminée à l'aide de la technique d'échographie (ultrasons). Les résultats donnés plus loin concernent dont les différences observées entre les valeurs obtenues pour ces deux paramètres entre le temps 0 et en fin de test, soit 4 semaines plus tard.

Le gel décrit dans l'exemple n°1 a été utilisé, si ce n'est que les deux peptides étaient absents du gel placebo.

Après 4 semaines de traitement biquotidien avec des gels (un gel placebo et un gel contenant les deux peptides N-Acetyl-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-OH et N-Palmitoyl-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-OH respectivement à 10^{-5} et 10^{-6} M/l), on constate une évolution favorable du périmètre et de l'épaisseur de la couche adipeuse sur les cuisses traitées à la préparation contenant les peptides lipolytiques: -13% et -15% respectivement, alors que la diminution de ces valeurs sur les cuisses traitées au placebo n'est pas significative.

Les peptides à caractère lipolytiques sont utilisés seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermopharmaceutique fini, dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants,

tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, poudre, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.

Il est possible d'utiliser ces peptides sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulés dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, les liposomes ou les chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

La concentration d'utilisation de ces peptides peut varier entre 0.000001 et 1% (p/p), préférentiellement entre 0.0001 et 0.1% dans le produit fini.

Ces peptides peuvent être combinés dans les compositions cosmétiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, extraits marins, etc.

Ces peptides sont obtenus par extraction de protéines de plantes, suivie d'hydrolyse enzymatique de façon à générer des fragments peptidiques de taille moyenne comprise entre 300 et 1500 daltons, une partie des fragments libérés devant contenir au moins une des séquence correspondant au pTH (1-n) avec n compris entre 3 et 10 inclus.

La combinaison avec d'autres agents stimulant la lipolyse tels que la caféine, la théophylline, les dérivés de xanthine en général est particulièrement avantageuse pour réaliser l'invention.

Ces peptides sont utilisés dans des compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutique pour des applications cosmétiques à activité lipolytique pour les soins de la peau, particulièrement le traitement amincissant des surcharges pondérales des cuisses et des hanches, dans le traitement de la cellulite et dans le raffermissement cutané.

Ces peptides ou les compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques les contenant sont utilisées pour la préparation d'un médicament pour les soins de la peau, particulièrement pour le traitement amincissant des surcharges pondérales des cuisses et des hanches, dans le traitement de la cellulite et dans le raffermissement cutané.

Revendications

1. Peptides fragments du pTH(1-34) de structure suivante:



- où R^1 = H ou une chaîne alkyle linéaire ou branchée, saturée ou insaturée, hydroxylée ou soufrée ou non, contenant 1 à 24 atomes de carbone, préférentiellement 12 à 18 atomes de carbone,
- R^2 = H, ou une chaîne alkyle de C1 à C24, préférentiellement soit C1 à C3, soit C14 à C18 ou $\text{O-R}^2 = \text{NR}^3\text{R}^4$ avec R3 et R4 étant indépendamment l'un de l'autre =H ou une chaîne alkyle de 1 à 12 atomes de carbone, préférentiellement de 1 à 3 atomes de carbone,
- AA est, tout ou partie, de la séquence peptidique suivante : Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn (pTH(1-10)), préférentiellement Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln (pTH(1-6)), et n compris entre 3 et 10 inclus, préférentiellement entre 3 et 6.

2. Peptides selon la revendication 1 obtenus par synthèse chimique, par voie enzymatique, par fermentation ou par extraction de protéines d'origine végétale.
3. Peptides selon 1 à 2 obtenus par synthèse peptidique classique en phase homogène ou hétérogène ou par synthèse enzymatique à partir des acides aminés constitutifs.
4. Peptides selon les revendications 1 à 3 obtenus par extraction de protéines de plantes, suivie d'hydrolyse enzymatique de façon à générer des fragments peptidiques de taille moyenne comprise entre 300 et 1500 daltons, une partie des fragments libérés devant contenir au moins une des séquence correspondant au pTH (1-n) avec n compris entre 3 et 10 inclus.
5. Peptides selon les revendications 1 à 4 caractérisés en ce que leur lipophilie est augmentée par greffage d'un acide gras de plus ou moins longue chaîne (mirystyl, palmityl, stéaryl, lipoyl...) sur l'amine N-terminale et/ou d'estérifier le groupe carboxyle du peptide.
6. Utilisation des peptides, selon les revendications 1 à 4 ou selon la revendication 5, seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, à des concentrations variant entre 0.000001 et 1% (p/p), préférentiellement entre 0.0001 et 0.1%.

- 5 7. Utilisation des peptides, selon les revendications 1 à 4 et 6 ou selon les revendications 5 à 6, seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulées dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro-ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.
- 10 8. Utilisation des peptides, selon les revendications 1 à 4 et 6 à 7 ou selon les revendications 5 à 7, seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, poudre, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.
- 15 9. Utilisation des peptides selon les revendications 1 à 4 et 6 à 8 ou selon les revendications 5 à 8 seuls ou en association entre eux, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, avec tout autre ingrédient habituellement utilisé: lipides d'extraction et ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits de plantes, extraits tissulaires, extraits marins, caféine, théophylline, dérivés de la xanthine et autres agents lipolytiques.
- 20 10. Compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutique renfermant les peptides selon les revendications 5 à 8 utilisées dans les applications cosmétiques à activité lipolytique pour les soins de la peau, particulièrement le traitement amincissant des surcharges pondérales des cuisses et des hanches, dans le traitement de la cellulite et dans le raffermisssement cutané.
- 25 11. Utilisation des peptides selon les revendications 1 à 4 ou d'une composition cosmétique ou dermatopharmaceutique renfermant les peptides selon les revendications 5 à 8, pour la préparation d'un médicament pour les soins de la peau, particulièrement pour le traitement amincissant des surcharges pondérales des cuisses et des hanches, dans le traitement de la cellulite et dans le raffermisssement cutané.
- 30

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 562861
FR 9809193

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DE 44 34 551 A (FORSSMANN WOLF GEORG PROF DR D) 4 avril 1996 * le document en entier *	1-4
A,D	TANIGUCHI A ET AL: "Parathyroid hormone-induced lipolysis in human adipose tissue." JOURNAL OF LIPID RESEARCH, (1987 MAY) 28 (5) 490-4. JOURNAL CODE: IX3. ISSN: 0022-2275., XP002099124 United States * le document en entier *	1-11
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 avril 1999		Groenendijk, M
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

XP-002263331

1/2 - (C) FILE CAPLUS
STN CA Caesar accession number : 1817
AN - 1977:550594 CAPLUS
DN - 87:150594
TI - Preliminary investigations on some potential sources of protected methionine derivatives for ruminant rations
IN - Buttery, Peter J.; Manomai-Udom, Satit; Lewis, Dyfed
CS - Sch. Agric., Univ. Nottingham, Loughborough, UK
SO - Journal of the Science of Food and Agriculture (1977), 28(6), 481-5
CODEN: JSFAAE; ISSN: 0022-5142
DT - Journal
LA - English
AB - A series of N-substituted methionine (I) derivs. were investigated for their ability to resist degrdn. by the sheep rumen (rumen Me mercaptan concns.) but still to release I in the abomasum or duodenum (promotion growth in chicks receiving a I-deficient diet). When I was fed into the rumen via a fistula there was a marked and rapid rise in the Me mercaptan concn.; this rise was much smaller and peaked later when oleo I [38665-30-4], stearoyl I [21394-42-3], or C8-C10 I was administered, was nonexistent when hydroxymethyl I [64226-78-4] was administered. Hydroxymethyl I was the most effective of the derivs. promoting wt. gain and food intake in chicks, being as effective as I at a 0.1% level in the diet . All of the derivs. were as effective as methionine when given at 0.5% level in the diet . When present at a 2% dietary level hydroxymethyl I and oleoyl I produced a greater redn. in growth (relative to that produced at the 0.1% dietary level) than did I.
IT - 21394-50-3
RL: PRP (Properties)
(rumen degrdn. of, nutritional value in relation to)
RN - 21394-50-3 CAPLUS
CN - Methionine, N-(1-oxooctyl)- (9CI) (CA INDEX NAME)

CO2H O
:
:
:
:
leSCH2.....CH2.....CHNH.....C.....(CH2)6Me

THIS PAGE BLANK (USPTO)